

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑪ DE 3504385 A1

⑳ Aktenzeichen: P 35 04 385.7  
㉑ Anmeldetag: 8. 2. 85  
㉒ Off nlegungstag: 14. 8. 85

AM  
⑤① Int. Cl. 4:  
C07 K 15/06  
C 07 K 15/14  
A 61 K 35/16  
A 61 K 37/02

DE 3504385 A1

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①

09.02.84 GB 8403473

⑦① Anmelder:

The Special Trusters for St. Thomas' Hospital,  
London, GB

⑦④ Vertreter:

Manitz, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Finsterwald, M.,  
Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing., 8000 München;  
Rotermund, H., Dipl.-Phys., 7000 Stuttgart; Heyn, H.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:

Saundry, Richard Howard, Dr., Shooters Hill,  
London, GB; Savidge, Geoffrey Francis, Dr.med.,  
Pluckley, Kent, GB

⑤④ Verfahren zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII durch Adsorption auf einer unlöslichen Matrix, welche freie Sulfatgruppen aufweist, insbesondere auf Dextransulfat, sowie die selektive Elution hiervon.

Ein geeignetes Elutionsmittel zur Reinigung des von Willebrand-Proteins (Faktor VIIIIR : vWp) ist Citratpuffer bei pH = 6,85 mit einem Gehalt von 0,47 M Natriumchlorid und 2,14 mM Kalziumchlorid.

Ein geeignetes Elutionsmittel für die Reinigung des Faktor VIII-Komplexes (Faktor VIIIIR : Ag, Faktor VIIIIR : vWp und Faktor VIII : C) ist Citratpuffer bei pH-Werten zwischen 6,2 und 7,3 mit einem Gehalt von 1,0 M Glycin, 2,14 mM Kalziumchlorid und 0,5 M Natriumchlorid bei + 4° C.

DE 3504385 A1

MANITZ, FINSTERWALD & ROTERMUND 3504385

THE SPECIAL TRUSTEES  
FOR ST. THOMAS' HOSPITAL  
St. Thomas' Hospital  
London SE1 7EN, England

DEUTSCHE PATENTANWÄLTE  
DR. GERHART MANITZ · DIPL.-PHYS.  
MANFRED FINSTERWALD · DIPL.-ING., DIPL.-WIRTSCH.-ING.  
HANNES-JÖRG ROTERMUND · DIPL.-PHYS.  
DR. HELIANE HEYN · DIPL.-CHEM.  
WERNER GRÄMKOW · DIPL.-ING. (1939-1982)

BRITISH CHARTERED PATENT AGENT  
JAMES G. MORGAN · B.SC. (PHYS.), D.M.S.

ZUGELASSENE VERTRETER BEIM EUROPÄISCHEN PATENTAMT  
REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE  
MANDATAIRES AGRÉÉS PRÈS L'OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

8000 MÜNCHEN 22 · ROBERT-KOCH-STRASSE 1  
TELEFON (0 89) 22 42 11 · TELEX 5 29 672 PATMF  
TELEFAX (0 89) 29 75 75 (Gr. II + III)  
TELEGRAMME INDUSTRIEPATENT MÜNCHEN

München, den 08.02.1985  
S/Sv-S 4078

---

Verfahren zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes

---

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes oder eines oder mehrerer Bestandteile hiervon, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß eine unreine Präparation von Faktor VIII auf einer unlöslichen Matrix, welche freie Sulfatgruppen aufweist, adsorbiert wird und anschließend der Faktor VIII oder der gewünschte Faktor VIII-Bestandteil selektiv eluiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß als unlösliche Matrix Dextransulfat, Chondroitinsulfat oder sulfatierte Agarose verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Material von der unlöslichen Matrix unter Verwendung eines Puffers mit kontinuierlich oder diskontinuierlich ansteigender Salzkonzentration eluiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz ein Ammonium- oder Alkalimetallhalogenid, -formiat, -acetat, -sulfat oder -bicarbonat ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Material von der unlöslichen Matrix unter Verwendung eines Puffers mit kontinuierlich oder diskontinuierlich abnehmendem pH-Wert eluiert wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Reinigung des Faktor VIII-verwandten Willebrand-Proteins (Faktor VIIIIR:vWp), dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VIIIIR:vWp von der unlöslichen Matrix unter Verwendung eines Puffers mit einem pH-Wert von 6,0 bis 8,0 und einer Natriumchloridkonzentration von wenigstens 0,3 M eluiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer einen pH-Wert von 6,7 bis 7,0 und eine Natriumchloridkonzentration von wenigstens 0,4 M besitzt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die anfängliche Adsorption der unreinen Präparation von Faktor VIII bei einer Temperatur von 10°C bis 30°C durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Material

unter Verwendung eines Puffers, welcher Kalziumchlorid bei einer Konzentration von 1 bis 5 mM enthält, eluiert wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die unreine Präparation von Faktor VIII menschliches Plasma oder ein hieraus erhaltenes Kryopräzipitat ist.

Die Erfindung betrifft die Reinigung des Faktor VIII-Komplexes einschließlich des Faktor VIII-Koagulationsfaktors und/oder des Faktor VIII-verwandten von Willebrand-Proteins.

Der Faktor VIII ist ein Blutproteinkomplex, welcher bei den frühen Stufen der Blutkoagulation teilnimmt. Er zirkuliert in Spuren Mengen im normalen Plasma als ein Glycoprotein mit hohem Molekulargewicht. Dieser Komplex besteht aus einem Prokoagulant-Bestandteil (Faktor VIII:C), der biologisch inaktiv ist oder bei Hämophilie A fehlt, und einem weiteren Bestandteil, der dem Faktor VIII-verwandtes von Willebrand-Protein (Faktor VIII:vWp) genannt wird, wobei dieser bei der Plättchenaggregation mitwirkt und Verklebungseigenschaften aufweist. Dieses letztgenannte Protein wird quantitativ oder qualitativ im Plasma von an von Willebrand'scher Krankheit leidenden Patienten verändert. Es wird angenommen, daß der Komplex in vivo mit Lipoproteinen verbunden ist, welche wahrscheinlich zusätzliche Stabilität bewirken. Weiterhin wird angenommen, daß optimale Konzentrationen an Kalziumionen der Einheit des Faktors VIII:C zusätzliche Stabilität verleihen.

Die Hämorrhagiesymptome von Hämophilie A oder der von Willebrand'schen Krankheit werden durch Applikation des Faktors VIII von gesunden Spendern behandelt. Dies kann durch Transfusion des Gesamtplasmas in milden Fällen oder durch intravenöse Applikation von "Kryopräzipitat" in schwereren Fällen erfolgen.

Das Kryopräzipitat wird üblicherweise nach der Arbeitsweise von Pool et al., Nature 203 : 312 (1964), erhalten. Dies umfaßt das Einfrieren des Plasmas und dann dessen langsames Auftauenlassen auf 4 °C, wodurch sich die Bildung des Kryopräzipitates ergibt, das leicht bei 37 °C wieder aufgelöst werden kann. Die überwiegende Menge des Faktor VIII im Plasma wird in dem Kryopräzipitat gewonnen, dieses liefert daher eine geeignete Quelle für konzentrierten Faktor VIII für therapeutische Zwecke.

Die Behandlung von Hämophilie A und der von Willebrand'schen Krankheit mit Gesamtplasma oder Kryopräzipitat weist jedoch einige schwerwiegende Nachteile auf. Beispielsweise ist es schwierig, sicherzustellen, daß das Gesamtplasma frei von infektiösen Organismen ist, z.B. den für Hepatitis verantwortlichen Viren und den Viren, welche für das sogenannte "acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", d.h. das "erworbene Immunschwächensyndrom", verantwortlich sind. Irgendwelche solche Organismen werden höchstwahrscheinlich auch in das Kryopräzipitat überführt, das aus infiziertem Plasma erhalten wird.

Es wurden bereits beträchtliche Forschungsanstrengungen zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes unternommen. Obwohl das Ergebnis davon die Reinigung sowohl des Faktor VIII:C als auch des Faktors VIIIIR:vWp war, umfaßten die veröffentlichten Arbeitsweisen zur Reinigung zahlreiche getrennte Reinigungsstufen, so daß sich niedrige Ausbeuten ergaben, siehe Baugh et al., Biochimica Biophysica Acta 371 : 360 (1974) und Olson et al., J. Lab. Clin. Med. 89 : 1278 (1977), worin Ausbeuten von lediglich 20-40 % angegeben sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher ein einfacheres und wirtschaftlich vorteilhaftes Verfahren zur Reinigung sowohl des Faktors VIII:C als auch des Faktors VIIIIR:vWp.

Zur Lösung dieser Aufgabe dient das erfindungsgemäße Verfahren zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine unreine Präparation von Faktor VIII auf eine Affinität aufweisende Matrix mit freien Sulfatgruppen adsorbiert wird und anschließend die gewünschten Faktorbestandteile oder Faktorkomponenten selektiv eluiert werden.

In der GB-PS 2080312 ist die Verwendung einer unlöslichen, sulfatierten Matrix (Dextransulfatagarose) zur chromatographischen Trennung der Koagulationsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypaßaktivität, wobei

angenommen wird, daß dies der Faktor IXa ist, beschrieben. Dies sind die sogenannten Vitamin-K-abhängigen Koagulationsfaktoren, welche strukturell miteinander verwandt sind. Der Faktor VIII ist jedoch von diesen Faktoren strukturmäßig vollständig verschieden und es war vollkommen überraschend, daß er ebenfalls eine Bindung an einer unlöslichen, sulfatierten Matrix wie Dextransulfatagarose erfährt. Daß eine Anbindung des Faktor VIII-Komplexes an Dextransulfatagarose tatsächlich überraschend ist, wird auch durch die EP-PA 0022052 gezeigt. In dieser EP-Patentanmeldung ist eine Verfahrensweise zur Reinigung von Blutkoagulationsfaktoren beschrieben, wobei diese Arbeitsweise auf dem behaupteten Fehlen einer Bindung des Faktors VIII:C an sulfatierten Mucopolysacchariden unter den angegebenen Bedingungen beruht.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu existierenden Arbeitsweisen zur Reinigung von Faktor VIII schließen die hohen erzielten Ausbeuten, z.B. von 30-50 % des biologisch aktiven Faktors VIII:C und von 70-80 % des Faktors VIIIIR:vWp im Ausgangsmaterial, die Trennung von biologisch aktivem Material von inaktivem Material, die Erhaltung der Mehrfachformen mit höherem Molekulargewicht, von denen angenommen wird, daß sie in den Faktor VIIIIR:vWp-Aktivitäten eine Rolle spielen, eine verbesserte technische und wirtschaftliche Durchführbarkeit wegen seiner Einfachheit, die Anwendbarkeit bei ansatzweisen Verarbeitungen und das Fehlen irgendwelcher Anforderungen an komplizierte Laborausrüstungen oder technische Ausrüstungen ein. Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene, gereinigte Produkt enthält geringe Werte an sowohl Fibrinogen als auch an Fibronectin. Es wird angenommen, daß diese beiden Proteine ein einfaches Wiederansetzen von vorbekannten Präparationen des Faktor VIII verhindern.

Geeignete sulfathaltige Matrices schließen Dextransulfat oder Chondroitinsulfat und sulfatierte Agarose, gegebenenfalls gekuppelt an eine Trägermatrix wie Agarose oder Glasperlen, ein. Das bevorzugte Medium ist Dextransulfat, das weit vari-

ierendes Molekulargewicht, z.B. von 3500 bis 500 000 Daltons, besitzen kann. Die Verwendung einer Trägermatrix wie Agarose ergibt ein Medium mit einer festeren Struktur.

Die Adsorption des Gemisches und die nachfolgende selektive Elution des Faktors VIII kann entweder ansatzweise oder in einer konventionellen Chromatographiesäule durchgeführt werden. Die selektive Elution der adsorbierten Proteine kann durch Waschen der sulfathaltigen Matrix mit wässrigen Lösungen von steigender Salzkonzentration bei entweder konstanten oder verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden, wobei die Salzkonzentration kontinuierlich (z.B. linear) oder diskontinuierlich variiert werden kann.

Vorzugsweise wird der Faktor VIII unter Verwendung von Salzlösungen mit zunehmender Ionenstärke bei konstantem pH-Wert von 6,0 bis 8,0 und besonders bevorzugt bei einem pH-Wert von 6,2 bis 7,4 eluiert. Der Puffer ist vorzugsweise Citrat und Kalziumchlorid liegt vorzugsweise ebenfalls vor. Es wurde gefunden, daß niedrige Konzentrationen, z.B. 2 bis 5 mM an Kalziumchlorid bei der Erzielung hoher Ausbeuten an Faktor VIII:C vorteilhaft sind.

Ein besonders bevorzugtes Elutionsmittel für die Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp ist Citratpuffer, pH = 6,85, mit einem Gehalt von etwa 0,47 M Natriumchlorid und etwa 2,14 mM Kalziumchlorid. Ein bevorzugtes Elutionsmittel zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes (Faktor VIIIIR:Ag; Faktor VIIIIR:vWp und Faktor VIII:C) ist Citratpuffer bei einem pH-Wert zwischen 6,2 und 7,3 mit einem Gehalt von etwa 1,0 M Glycin, etwa 2,14 mM Kalziumchlorid und etwa 0,5 M Natriumchlorid.

Hohe Ausbeuten an Faktor VIII:C werden erzielt, falls der gesamte Arbeitsvorgang bei reduzierter Temperatur, z.B. 4°C, durchgeführt wird. Es wurde jedoch gefunden, daß die Anbindung des Faktors VIII-Komplexes an sulfatierte Matrices bei



4°C langsam vor sich geht, daher wird es bevorzugt, daß die anfängliche Adsorption bei einer Temperatur von 10° bis 30°C, z.B. bei 20°C, durchgeführt wird.

Die Quelle für den rohen Faktor VIII kann menschliches Gesamtplasma sein, welches bei dem erfindungsgemäßen Verfahren direkt eingesetzt werden kann. Die höchsten Ausbeuten werden mit Gesamtplasma erhalten. Gegebenenfalls kann jedoch das Plasma partiell gereinigt und/oder konzentriert sein, z.B. durch Kryopräzipitation, bevor es nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt (oder weiter gereinigt) wird.

Obwohl die Gesamtausbeuten an aus Kryopräzipitat erhaltenem Faktor VIII oftmals geringer als bei Verwendung von Plasma sind, ist dies das bevorzugte Ausgangsmaterial, da die überstehende Flüssigkeit der Gefrierbehandlung in geeigneter Weise zur Reinigung von anderen wirtschaftlich wichtigen Blutproteinen wie den Vitamin-K-abhängigen Koagulationsfaktoren und Albumin verwendet werden kann.

Die Reinigung des Faktors VIII gemäß der Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert. Die in diesen Beispielen angewandten Methoden zur Bestimmung des Faktors VIII und anderer Aktivitäten sind wie folgt:

#### Faktor VIII:C, der Prokoagulanzfaktor

Die Aktivität des Faktors VIII:C in unbekannten Proben wird durch Messung der Fähigkeit zur Korrektur der Koagulationszeit von Plasma mit einem Mangel an Faktor VIII:C / <sup>abgeschätzt.</sup> Es wird eine handelsübliche, zweistufige Bestimmungseinheit für Faktor VIII (Diagnostic Reagents Ltd., Thame, Oxon, England) bei diesen Untersuchungen eingesetzt. Diese basiert auf der von Denson K.W.E. (Trans. of the International Committee on Haemostasis and Thrombosis, Chapel Hill, North Carolina, USA, Dezember 1966) entwickelten Methode, welche auf dem zweistufigen Thromboplastinbildungstest von Biggs, Eveling und Richards, 1955, beruht. Hierzu werden Reihenverdünnungen der

Testmaterialien und von standardmäßigem, normalem, gepooltem Plasma als Kontrolle bei 37°C für zehn Minuten mit normalem Serum, Phospholipid und Koagulationsfaktor (Gerinnungsfaktor) V inkubiert. Die Mischungen werden dann in normalem Substratplasma in Teilmengen unterteilt und die zur Ausbildung der Fibringerinnung erforderliche Zeit gemessen. Es wird eine direkte, lineare Beziehung zwischen der Koagulationszeit und der Konzentration an Faktor VIII:C gefunden.

#### Untersuchung auf Ristocetin-Cofaktor

Zusätzlich zu der Prokoagulieraktivität des Faktors VIII (Faktor VIII:C) zeigt der Faktor VIIIR:vWp in dem Faktor VIII-Komplex eine Plättchenaggregationsaktivität in Anwesenheit des rudimentären Antibiotikums Ristocetin. Diese Aktivität wird als Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (Faktor VIIIR:CoF) bezeichnet, und es wird weit verbreitet angenommen, daß sie das Äquivalent der Aktivität des von Willebrand-Faktors, Faktor VIIIR:vWp, ist. Bei der Untersuchung werden normale Plättchen, welche chemisch mit Formalin fixiert sind, mit den Testproben vermischt, und das Antibiotikum Ristocetin wird zugesetzt, wodurch die Aggregation der Plättchen induziert wird. Der Zeitverlauf dieser Aggregation kann durch Lichttransmissionsmessungen bei einer guten Korrelation zwischen der Anfangsgeschwindigkeit der Aggregation und der Menge an Faktor VIII :vWp in den Testproben verfolgt werden. Durch Vergleich mit Testproben mit bekannter, standardmäßiger Konzentration an Faktor VIIIR:vWp kann die Menge des Faktors VIIIR:vWp in den nicht bekannten Proben berechnet werden.

#### Immununtersuchungsmethoden:

##### (1) Elektroimmununtersuchung

Hochgereinigter Faktor VIII-Komplex vom Menschen kann zur Erhöhung der heterologen Antiseren in Kaninchen mit hoher Titeraktivität, welche gegen die Moleküle des Faktors VIII gerichtet ist, benutzt werden. Diese Antiseren reagieren

unverändert mit menschlichem Faktor VIII unter Bildung von Präzipitaten oder Ausfällungen, falls das korrekte Verhältnis von Faktor VIII zur Antiserumkonzentration erreicht wird. Diese Erscheinung kann ausgenutzt werden, um mäßig empfindliche Techniken zur Abschätzung von antigenen Determinantien (Faktor VIII:Ag) auf den Faktor VIII:vWp zu entwickeln. Bei der konventionellen immunoelektrophoretischen Methode (Laurell, C.B. (1966) *Analytical Biochemistry* 15 : 45) wird das spezifische Antiserum in Agarosegel eingebaut, durch welche der Faktor VIII elektrophoresiert werden kann. Wenn die Proteine wandern, treten sie mit dem Antiserum in Wechselwirkung, wobei die Ausbildung von Ausfällungen bewirkt wird. Nach einer geeigneten Zeit wird die Elektrophorese gestoppt und die Proteinausfällungen werden fixiert und gefärbt. Die Antikörper-Antigen-komplexe werden als "Präzipitationsgebirge" sichtbar gemacht, wo ihre Höhen proportional zu der Menge an in den ursprünglichen Proben vorhandenen Faktor VIII-Antigen proportional sind.

Eine Modifizierung dieser Technik kann angewandt werden, hierdurch ist es möglich, eine qualitative Information über die Größe der Faktor VIII-Komplexe in einer vorgegebenen Probe zusammenzutragen. Diese Technik ist als "zweidimensionale, gekreuzte Elektrophorese" (2 DCIE) bekannt. Die Probe wird durch Agarosegel bei Abwesenheit von Zusatzantiserum der Elektrophorese unterzogen, wenn die Wanderung proportional zur Größe der Moleküle beobachtet wird. Nach einer geeigneten Zeitspanne werden die Proteine erneut der Elektrophorese (in einer Richtung senkrecht zur Richtung der ersten Elektrophorese) in ein zweites Agarosegel unterzogen, in welchem das Antiserum eingebaut worden ist. Nach dem Fixieren und Färben der Ausfällungslinien kann der durch den Faktor VIII in der ersten Dimension zurückgelegte Abstand gemessen werden, und die Molekülgröße abgeschätzt werden.

(2) Enzymgebundener Immunotest (ELISA):

Heterologes Kaninchenantiserum mit hoher, gegen menschlichen Faktor VIIIIR:Ag gerichteter Titeraktivität wird in den Löchern von speziell ausgelegten Mikrotiterplatten bei alkalischem pH immobilisiert. Nach Entfernung von überschüssigem Antiserum werden Serienverdünnungen von Testproben und Standardproben mit diesen Platten bei neutralem pH in Anwesenheit von grenzflächenaktiven Stoffen zur Verhinderung einer nicht-spezifischen Adsorption an der Oberfläche inkubiert. Die Platten werden gründlich von nichtgebundener Probe freigewaschen, und dann mit mehr des gleichen Antiserums reagieren gelassen, jedoch wo die Antikörper zuvor chemisch an das Enzym, Meerrettichperoxidase, chemisch gekuppelt wurden.

Die Menge des enzymgebundenen Antiserums, welches auf den Platten gebunden wird, steht in direkter Beziehung mit der Menge an Faktor VIIIIR:Ag in den Löchern, welche durch das erste Antiserum immobilisiert worden sind. Dies kann durch Verwendung eines ausgewählten spezifischen Enzymsubstrates und Messung der Menge an gefärbtem Produkt durch Lichtabsorptionsmeßmethoden quantitativ bestimmt werden. Die Vorteile der ELISA-Technik liegen darin, daß sie weniger Zeit benötigen, hinsichtlich der Verwendung des heterologen Antiserums wirtschaftlicher sind und in gleicher Weise wie die konventionelle Elektroimmunotestmethode empfindlich sind.

(3) Radioimmununtersuchung (RIA)

Es wurde hochgereinigter Faktor VIIIIR:vWp nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt und mit  $^{125}\text{I}$  mittels einer Modifizierung der Jodmonochloridmethode radioaktiv makiert. Dieses makierte Material konnte dann bei einem Verdrängungstest auf Faktor VIIIIR:vWp verwendet werden, wenn eine begrenzte Menge eines Kaninchenantiserums, das spezifisch für den menschlichen Faktor VIIIIR:vWp ist, in den Mischungen des makierten und des nichtmakierten Mate-

rials verwendet wurde. Die Antikörper-Antigen-komplexe wurden von dem nichtgebundenen Antigen (überschüssiger Faktor VIIIIR:vWp) abgetrennt und ihre Radioaktivität ausgezählt. Es besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen der in den Komplexen gefundenen Radioaktivität und der Menge des in den Testproben vorliegenden Faktors VIIIIR:vWp. Die Werte für den Faktor VIIIIR:vWp konnten dann unter Verwendung von Standardkurven oder Eichkurven berechnet werden, welche aus den Ergebnissen bei Serienverdünnungen von Standardkonzentraten des Faktors VIIIIR:vWp erhalten worden waren. Der große Vorteil der RIA im Vergleich zu konventionellen immunoelektrophoretischen Methoden ist die sehr viel größere Empfindlichkeit, wodurch eine genaue Abschätzung der Werte des Faktors VIIIIR:vWp in der Größenordnung von 0,1 % des in normalen Plasmaproben gefundenen Werte möglich ist.

(4) Multimergrößentechnik

Es ist bekannt, daß der Faktor VIIIIR:vWp im normalen Plasma in Form polymerer (multimerer) Aggregate des Grundmolekülkomplexes des Faktors VIII zirkuliert. Es wird angenommen, daß die Aktivität des Faktor VIII/von Willebrand-Faktor/Ristocetin-cofaktor nur bei größeren multimeren Formen vorkommt, welche im Plasma von Patienten mit von Willebrand'scher Krankheit fehlen oder reduziert sind. Diese multimeren Formen können unter Anwendung einer Modifizierung der Multimergrößentechnik von Ruggeri und Zimmermann (Z.M. Ruggeri und T.S. Zimmermann (1981) Blood 57: 1140-1143; M.S. Enayat und F.G.H. Hill (1983) J. Clin. Pathol. 36 : 915-919) identifiziert werden.

Hierzu werden verschiedene multimere Formen des Faktors VIII mit 8M Harnstoff/2 % Natriumdodecylsulfat vorbehandelt, um die verschiedenen multimeren Formen voneinander zu dissoziieren, diese werden entsprechend ihren relativen Größen durch Elektrophorese in 0,8 % Agarose/2,5 %

Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteine werden dann fixiert und gründlich gewaschen, hieran schließt sich die Inkubation mit auf Faktor VIII spezifischem, radiomarkiertem Antiserum an. Überschüssiges, nichtgebundenes Antiserum wird durch Waschen entfernt, und die Komplexe von Faktor VIII/radiomarkiertem Antifaktor VIII werden in den Gelen durch autoradiographische Arbeitsweisen sichtbar gemacht, wobei<sup>durch</sup> die Intensität der Belichtung von Röntgenfilmen und die relative Beweglichkeit der Moleküle des Faktors VIII: vWp während der elektrophoretischen Arbeitsweisen Informationen hinsichtlich der Zahl, der Konzentration und der Größe der multimeren Formen von Faktor VIII, wie er in der ursprünglichen Probe vorliegt, geliefert werden. Eine alternative Methode wurde entwickelt, um das nach elektrophoretischen Arbeitsweisen aufgetrennte Protein zu lokalisieren und quantitativ zu bestimmen. Nach dem Fixieren und dem gründlichen Waschen mit destilliertem Wasser wird das Gel zunächst mit Kaninchen-Antimensch-Faktor VIII:Ag in Phosphatpuffer mit einem Gehalt von 0,1 % eines grenzflächenaktiven Stoffes (Tween 20) inkubiert, nach der Entfernung von überschüssigem, nichtgebundenem Kaninchen-Antiserum wird das Gel mit Schweine-Antikaninchen-Immunoglobulin inkubiert, daran schließt sich die Inkubation mit peroxidase-gebundenem Kaninchenimmunoglobulin an. Nach gründlichem Waschen wird das Gel mit 0,05 % des Enzymsubstrates Diaminobenzidin und 0,2 % Wasserstoffperoxid überschichtet. Nach vollständiger Färbung kann das Gel gewaschen, getrocknet und gelagert werden, und die Banden können durch konventionelle Photographie sichtbar gemacht werden oder durch Messung der Farbintensität der gefärbten Banden nach standardmäßigen, spektrophotometrischen Abtastarbeitsweisen quantitativ ausgemessen werden.

(5) Immunoradiometrische Untersuchung auf Faktor VIII:Ag

Schwerkranke Hämophilie-Patienten, welche viele Transfusionen erhalten haben, entwickeln manchmal Inhibitoren

gegen den normalen Faktor VIII:C. Es wurde gezeigt, daß solche Inhibitoren Immunglobulinantikörper (Immunglobulin = IgG) sind und daß sie aus dem Plasma solcher Patienten isoliert und bei einer empfindlichen Methode zur quantitativen Bestimmung des mit der Aktivität des Faktors VIII:C verbundenen Antigens (Faktor VIIIC:Ag) verwendet werden können. Die gereinigten IgG-Moleküle mit Antifaktor VIIIC:Ag-Aktivität werden durch das proteolytische Enzym Pepsin unter reduzierenden Bedingungen abgebaut, wobei niedermolekulare aktive Fragmente (Fab/) erhalten werden, welche immer noch ihre Antifaktor VIIIC:Ag-Aktivitäten beibehalten. Eine solche Präparation kann mit  $^{125}\text{I}$  nach konventionellen Methoden radioaktiv markiert werden und im Überschuß zu einer geeigneten Verdünnung der Testproben zugesetzt werden. Nach der Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  während 4 Stunden werden die Proteine, welche die Faktor VIIIC:Ag-Fab/-komplexe mit hohem Molekulargewicht einschließen, selektiv mit gesättigtem, 38 %igen Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Radioaktivität in diesen Ausfällungen wird bestimmt. Es besteht eine gute Korrelation zwischen der Menge an Faktor VIIIC:Ag in der Probe und der in den Ausfällungen gefundenen Radioaktivitätsmenge. Absolutwerte können durch Vergleich mit Verdünnungen von Standardproben mit einem Gehalt des Faktors VIIIC:Ag, welche durch die ganze Testarbeitsweise gleichzeitig durchgeführt wurden, abgeschätzt werden.

#### Plättchenbindungsuntersuchung

Radioaktiv markierter Faktor VIIIR:vWp kann bei einem extrem empfindlichen Test auf Bindung des Faktors VIII an Formalinfixierte Plättchen bei Abwesenheit von Ristocetin verwendet werden. Plättchen werden aus den Plasmen von normalen Spendern isoliert, mit Formalin fixiert und bis zum Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bekannte Mengen an mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem Faktor VIII werden zu Testproben zugesetzt und mit dem "kalten" (inaktiven) Faktor VIII für eine begrenzte Anzahl von Plättchen in Anwesenheit von Ristocetin bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Konkurrenzreaktion treten gelassen. Nach einer halben Stunde werden die Plättchen

durch Zentrifugieren entfernt und geeignete Teilmengen der überstehenden Flüssigkeit für die Messung der Radioaktivität entnommen.

Das Vorhandensein von Isotop in den überstehenden Flüssigkeiten ist proportional der Menge an Faktor VIIIIR:vWp in den Testproben, und die absoluten Mengen können unter Heranziehung einer Standardkurve oder Eichkurve berechnet werden, welche aus Daten konstruiert wurde, die unter Verwendung von Standardproben des Faktors VIIIIR:vWp erhalten worden waren.

#### Messung der Aktivitäten von proteolytischem Enzym-

Der Faktor VIII-Komplex kann eine Inaktivierung durch Verunreinigung mit Aktivität von proteolytischem Enzym erfahren. Zahlreiche dieser Enzyme können während der bei der Erfindung angewandten Arbeitsweisen aktiviert werden, und eine Verunreinigung des Endproduktes kann seine Brauchbarkeit bei therapeutischen Anwendungen begrenzen. Es wird angenommen, daß die wahrscheinlichsten Verunreinigungen bei Präparationen des Faktors VIII Thrombin (Faktor IIa) und aktivierter Gerinnungsfaktor X (Faktor Xa), plus den Kontaktfaktoren (Faktoren XIa und XIIa) sind. Die Aktivitäten von proteolytischem Enzym können unter Verwendung von spezifischen chromogenen Substraten (S2222 zur Messung der Faktor Xa-Aktivität, S2238 für Thrombin und S2302 für Plasma Kallikrein) abgeschätzt werden. Die Substrate waren handelsüblich (von KabiVitrum AB, Stockholm, Schweden), und sie wurden durch eine Modifizierung der vom Hersteller empfohlenen Arbeitsweise bei Mikrotiterplatten eingesetzt, wobei die Enzymkinetik durch spektrophotometrische Absorptionsmethoden überwacht wurde.

#### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Faktor VIII enthaltende Fraktionen, welche aus den unter Verwendung der erfindungsgemäß eingesetzten Affinitätsmatrizes durchgeführten Chromatographiearbeitsweisen herrührten, wurden auf die Molekulargewichtsverteilung des Proteins mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwen-



dung von handelsüblichen Gelfiltrationssäulen (entweder TSK-SWG-4000 (void exclusion Molekulargewicht 1 000 000 Daltons) oder TSK-SWG-3000 (void exclusion-Molekulargewicht 500 000) von Beckmann RII C, High Wycombe, Bucks. England) untersucht. Diese Säulen wurden verschiedenartig, bei 0,5 oder 1,0 ml/min, betrieben und mit Puffern entwickelt, welche 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid, 0,15 M Natriumchlorid, pH = 7,0, umfaßten.

#### Enzymgebundene Immununtersuchungen (ELISA) auf anderes Plasma-protein

Es sind Antiseren mit hohen Titerwerten und großer Spezifizität gegen verschiedene Antigene im Handel erhältlich. Unter Anwendung der gleichen für den ELISA-Test auf Faktor VIIIIR:Ag ausgearbeiteten Prinzipien wurden spezifische ELISA-Tests zur Messung der Antigene, welche mit den normalen Plasmaproteinen Fibrinogen, Fibronectin (kalt unlösliches Globulin, CIG), Plasminogen, Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM), Gerinnungsfaktor IX,  $\alpha$ -Lipoproteinen (HDL<sub>2</sub>, Molekulargewicht 350 000 Daltons, und HDL<sub>3</sub>, Molekulargewicht 250 0000 Daltons) und  $\beta$ -Lipoprotein (VLDL, Molekulargewicht größer als 10 000 000 Daltons und LDL, Molekulargewicht 3 000 000 Daltons) assoziiert sind.

#### Beispiel 1

#### Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp aus Kryopräzipitat durch Säulen-chromatographie

Eine wässrige Lösung von Dextransulfat (15 mg/ml) wurde durch Auflösen von Dextransulfat mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 500 000 Daltons (Produkt von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) hergestellt. 360 ml der Dextransulfatlösung wurden zu 600 ml von abgesetztem, gewaschenem Sepharose 6B oder Sepharose 4B (Produkt von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) zugesetzt und unter Rühren auf +4°C in einem mit Eis gekühltem Reaktionsbehälter abgekühlt. Der pH-Wert wurde auf 11,0 eingestellt, und es wurden 12 g Bromcyan zugesetzt und gerührt. Der pH-Wert wurde zwischen 10,0 und 11,3 durch

Zusatz von 4 N Natriumhydroxidlösung gehalten, und die Reaktion wurde 45 Minuten bei 4°C ablaufen gelassen. Die Zugabe von Natriumhydroxidlösung wurde unterbrochen, und die Reaktionsteilnehmer wurden unter konstantem Rühren auf Zimmertemperatur erwärmen gelassen, und der pH-Wert wurde sich auf 8,5 stabilisieren gelassen. Die Mischung wurde über Nacht bei Zimmerumgebungstemperatur stehengelassen, danach wurde das Harz mit 0,2 M Natriumborat/0,5 M Natriumchlorid bei pH = 8,5 und dann anschließend mit 0,2 M Natriumacetat/0,5 M Natriumchlorid bei pH = 4,0 gewaschen. Das Harz wurde in eine silikonbehandelte Glassäule eingegossen und mit 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid und 0,15 M Natriumchlorid, pH = 6,85, ins Gleichgewicht gesetzt. Das aus Einzelspenden von citratbehandeltem Gesamtblut erhaltene Kryopräzipitat wurde in annähernd 40 ml des Gleichgewichtspuffers wieder aufgelöst und mit 1/10 Volumen Aluminiumhydroxid (0,25 g/ml) für drei Minuten bei 37°C behandelt, um die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren zu entfernen. Das Aluminiumhydroxid wurde Zentrifugieren entfernt, und die überstehende Flüssigkeit wurde auf die Säule aufgegeben und bei Zimmertemperatur eluiert, bis die optische Dichte bei 280 nm vom Eluat dieselbe wie in dem Elutionspuffer war. Ein linearer Salzgradient von 0,15 - 1,0 M Natriumchlorid in 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid bei pH = 6,85 wurde dann aufgegeben, und der Faktor VIIIR:vWp eluierte scharf als Einzelkomponente bei einer Salzkonzentration von annähernd 0,47 M Natriumchlorid. Es wurde beobachtet, daß der Faktor VIIIR:vWp nachfolgend auf irgendwelche nachweisbaren Mengen von Fibrinogen, Faktor IXa und Faktor XI eluiert. Spurenmengen von Fibronectin, Faktor VIII:C (bis zu 1 % der auf die Säule aufgegebenen Gesamtmenge) und Faktor VIIIR:Cag (bis zu 5 % der Gesamtmenge) waren in dem absteigenden Ast des Peaks (der Spitze) des Faktors VIIIR:vWp vorhanden. Die Ausbeuten an Faktor VIIIR:vWp machten annähernd 85 % des auf das Reinigungssystem aufgegebenen Faktors VIIIR:vWp aus. Es wurde gezeigt, daß das Protein in hoch multimerer Form vorliegt und annähernd 65 % des in dem Anfangsmaterial aufgegebenen Faktor VIIIR:Ag-gehaltes enthält, wobei die anderen 35 % des Faktors VIIIR:Ag in der anfänglichen

Leerfraktion vorlagen, wobei jedoch nicht nachweisbare Aktivität des Faktors VIIIIR:vWp mit dem Faktor VIIIC:Ag vorlag, die nur einen Bruchteil ( $<5\%$ ) der Anfangs-VIII:C-aktivität besaß.

### Beispiel 2

#### Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp aus Gesamtplasma durch Säulenchromatographie

100 ml frisches, an Plättchen armes Plasma wurde mit 10 ml Aluminiumhydroxidlösung (0,25 g/ml) während drei Minuten bei 37°C absorbiert, dann wurde das Aluminiumhydroxid durch Zentrifugieren entfernt. Dieses absorbierte Plasma wurde dann mit einem gleichen Volumen an Gleichgewichtspuffer, bestehend aus 0,15 M Natriumchlorid, 14 mM Trinatriumcitrat und 2,14 mM Kalziumchlorid, pH = 6,85, vermischt. Diese Mischung wurde auf eine Säule von 65 x 1,8 cm, gefüllt mit an Sepharose 4B gekuppeltem Dextransulfat (hergestellt wie in Beispiel 1), aufgegeben und mit Elutionspuffern bei 36 ml/h unter Auffangen von Fraktionen von 10 ml bei Zimmertemperatur entwickelt. Nach dem Waschen der Matrix mit Puffer wurde ein linearer Gradient von 0,15 - 0,80 M Natriumchlorid aufgegeben und die dem Faktor VIIIIR:vWp entsprechenden Fraktionen wurden bei 0,47 M Natriumchlorid eluiert. Die Endausbeute an Faktor VIIIIR/vWp wurde zu 90 % der auf die Säule aufgegebenen Aktivität bestimmt.

### Beispiel 3

#### Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp aus Gesamtplasma durch Salzgradientenchromatographie unter Verwendung anderer Salze als Natriumchlorid

Die in Beispiel 2 angewandten Arbeitsweisen wurden zur Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp aus Gesamtplasma mit geringem Plättchengehalt modifiziert, wobei andere Salze in den Gradientenlösungen anstelle von Natriumchlorid verwendet wurden. Um die Lokalisierung der Peaks mit einem Gehalt an Faktor VIIIIR/vWp zu erleichtern, wurden 1,0 ml radio-markierter Faktor VIIIIR:vWp zu 2 ml Plasma (im Anschluß an die Behandlung mit Aluminiumhydroxid) plus 7 ml Anfangspuffer zugesetzt und das Gemisch wurde auf eine Säule von Dextransulfat-Sepharose 4B-Matrix

von 30 x 0,9 cm aufgegeben und bei Zimmerumgebungstemperatur entwickelt. Es wurden zwei identische Säulen parallel gefahren, um einen direkten Vergleich des untersuchten Salzes mit dem Effekt von Natriumchlorid zu ermöglichen. Der Anfangspuffer bestand aus 14 mM Trinatriumcitrat und 2,14 mM Kalziumchlorid, pH = 6,85. Die Salze enthaltenden Puffergradienten umfaßten immer den Anfangspuffer plus die gewählte Salzkonzentration bei pH = 6,85. Die Radioaktivitätspeaks wurden auf Faktor VIIIIR:Ag durch Elektroimmunotest, Faktor VIIIIR-Plättchenbindungsaktivität und Faktor VIIIIR:CoF-aktivität geprüft. In allen Fällen fielen die durch die Salzgradienten entwickelten Spitzen der Radioaktivitäten mit den meßbaren Faktor VIIIIR-aktivitäten zusammen. Das radioaktiv markierte Material verhielt sich identisch zum Faktor VIIIIR:vWp im Plasma bei der Chromatographiearbeitsweise. Die gewählten Salze besorgten die Elution des Faktors VIIIIR:vWp bei unterschiedlichen Konzentrationen; die Molarität des Salzes, bei welchem die Aktivitätsspitze unter Verwendung verschiedener Salzgradienten eluiert wurde, ist in der Tabelle I gezeigt. Bei diesen Versuchsreihen wurde der pH-Wert auf pH = 6,85 gehalten, wobei dies der pH-Wert war, bei welchem die stärkste Affinität des Faktors VIIIIR im Natriumchlorid beobachtet wurde. Die einzige Ausnahme war die Untersuchung mit Ammoniumbicarbonat, wobei der Gradient von 0,05 bis 1,2 M Ammoniumbicarbonat bei pH = 7,7 verlief. Zahlreiche lösliche Salze können statt Natriumchlorid bei den zur Elution des Faktors VIIIIR:vWp aus der Matrix verwendeten Gradientenlösungen verwendet werden.

TABELLE I

<u>SALZ</u>	<u>MOLARITÄT, BEI DER VIIIIR:vWp ELUIERTE</u>	
Natriumchlorid	NaCl	0,464
Lithiumchlorid	LiCl	0,944
Kaliumchlorid	KCl	0,286
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	0,733
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	0,427
Natriumfluorid	NaF	0,733
Natriumbromid	NaBr	0,381

Fortsetzung Tabelle I

Natriumformiat	$\text{NaHCO}_2$	0,575
Ammoniumformiat	$\text{NH}_4\text{HCO}_2$	0,730
Natriumacetat	$\text{NaCH}_3\text{CO}_2$	0,644
Natriumsulfat	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,354
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,420
Ammoniumbicarbonat	$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	0,529

Beispiel 4

Reinigung des Faktors VIII-Komplexes aus Plasma durch Säulen-  
chromatographie mit Ammoniumchloridgradienten

Die gemäß den Angaben in Beispiel 1 hergestellte Matrix aus Dextransulfat-Sepharose 4B wurde in zwei identische, mit Silikon behandelte Glassäulen von 30 x 0,9 cm eingefüllt und mit 14 mM Trinatriumcitrat/2,14 mM Kalziumchlorid bei 4°C bei einer konstanten Strömungsrate von 20 ml/h ins Gleichgewicht gesetzt. 9 Volumina frisches, citratbehandeltes Plasma mit geringem Plättchengehalt wurden mit 1 Volumen Aluminiumhydroxid (0,25 g/ml) bei 37°C für 3 Minuten behandelt, und das Aluminiumhydroxid wurde durch Zentrifugieren entfernt. 10 ml des an Aluminiumhydroxid absorbierten Plasmas und 10 ml des nichtabsorbierten Plasmas wurden jeweils getrennt zu den zwei Säulen gegeben und parallel zueinander unter Anwendung derselben Gradienten für beide Säulen eluiert. Nachdem das Leermaterial eluiert worden war, wurde ein linearer Salzgradient, enthaltend 380 ml Gleichgewichtspuffer und 380 ml desselben Puffers mit einem Gehalt von 0,8 M Ammoniumchlorid durch beide Säulen gleichzeitig durchlaufen gelassen. Es wurden Fraktionen von 3,5 ml aufgefangen und auf die Gehalte von Faktor VIIIR:Ag, Fibrinogen, Fibronectin, Faktor VIIIR:CoF, Faktor VIIIC:Ag und Faktor VIII:C untersucht und die Gesamtausbeuten wurden im Vergleich zu Plasmaproben berechnet, welche während der Dauer des Versuchs bei 4°C inkubiert worden waren. Es wurde gefunden, daß keines der untersuchten Proteine in dem Leermaterial, welches aus den Säulen eluiert wurde, vorlag, und beide Säulen ergaben identische Profile. Fibrinogen eluierte

als charfe Spitze (Peak) bei 0,20 M Ammoniumchlorid, Fibronectin bei 0,33 M Ammoniumchlorid und Faktor VIIIIR:CoF/Faktor VIIIIR:Ag bei 0,53 M Ammoniumchlorid. Der Faktor VIIIC:Ag wurde teilweise von der Masse des Faktors VIIIIR:Ag getrennt, und eluierte zuerst als kleine Aktivitätsspitze zusammen mit dem Fibrinogen und an zweiter Stelle als zweiter Hauptpeak, der unmittelbar vor dem Peak Faktor VIIIIR:Ag/R:CoF eluierte jedoch diesen überlappte, bei 0,45 M Ammoniumchlorid. Dieser letztgenannte Faktor VIIIC:Ag-Peak enthielt signifikante Mengen an aktivem Faktor VIII:C (wie durch den 2-Stufen-Test) bestimmt wurde. Die Gesamtausbeuten waren 86 % Faktor VIIIIR:Ag, 50 % Faktor VIIIC:Ag, 100 % Faktor VIIIIR:CoF, 50 % Fibrinogen und 75 % Fibronectin. Die Gesamtausbeute an Faktor VIII:C betrug 25 %, falls das mit Aluminiumhydroxid absorbierte Material verwendet wurde, jedoch lediglich 10 %, wenn nicht-absorbiertes Material eingesetzt wurde.

Es wurde gefunden, daß der größere Teil der Aktivitäten an Kallikrein und thrombinähnlichem Enzym nicht in der Säule adsorbiert wurden und zusammen mit der Leerfraktion eluierten. Die dem Faktor VIIIIR:vWp und dem Faktor VIII:C entsprechenden Fraktionen enthielten nur Spuren an Aktivitäten an Kallikrein und thrombinähnlichem Enzym. Diese Werte waren durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxid reduziert worden. Es lagen noch immer signifikante Mengen an Faktor Xa-ähnlicher Aktivität vor, jedoch im Anschluß an die Ausfällung der Proteine in der Fraktion unter Verwendung von 10 % (Gew./Vol.) Polyethylenglykol 6000 bei 4°C, blieb diese Faktor Xa-Aktivität in der überstehenden Flüssigkeit bei guter Gewinnung des Faktors VIII in den Ausfällungen (Präzipitaten) zurück.

#### Beispiel 5

#### Reinigung des Faktor VIII-Komplexes aus Kryopräzipitat durch Säulenchromatographie mit Natriumchloridgradienten

Eine silikonbehandelte Glassäule von 60 x 1,6 cm wurde mit dem in Beispiel 1 hergestellten, an Sepharose 4B gebundenen Dextran-sulfat gefüllt und bei 4°C und 36 ml/h mit 14 mM Trinatrium-

citrat, 2,14 mM Kalziumchlorid bei pH = 6,85 ins Gleichgewicht gesetzt. 100 ml Blut von einem normalen Spender wurde in 1/10 Volumen von 3,8 % Trinatriumcitrat gesammelt, und es wurde plättchenarmes Plasma im Anschluß an ein Zentrifugieren bei 2000 x g bei 4°C während 30 Minuten erhalten. Das Plasma wurde in sechs getrennte Teilmengen von 10 ml in Polypropylenröhrchen aufgeteilt und über Nacht bei -80°C gelagert. Im Anschluß an das Auftauen bei 4°C und ein Zentrifugieren bei 4°C mit 2000 x g während 30 Minuten wurde die überstehende Flüssigkeit verworfen. Zu dem erhaltenen Kryopräzipitat in jedem Röhrchen, resuspendiert in 5 ml des Gleichgewichtspuffers bei 37°C, wurden 1 ml einer 50 Vol./Vol.-% Suspension von Gelatine, welche an Sepharose 4B entsprechend der Arbeitsweise von Cuatrecasas P, Wilchek M und Anfinsen C.B. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61 : 6367-643 gekuppelt und zuvor mit dem gleichen Puffer ins Gleichgewicht gesetzt worden war, zugesetzt. Nach dem Mischen wurden die Röhrchen weiter bei 37°C für 15 Minuten vor einem Zentrifugieren bei 3300 x g während 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 5 ml der überstehenden Flüssigkeit aus jedem der sechs Röhrchen wurden entnommen, kombiniert und auf die Chromatographiesäule aufgegeben. Nachdem die Elution von nichtgebundenem Material als vollständig bestimmt worden war, wurde ein linearer Natriumchloridgradient, enthaltend 180 ml Anfangspuffer und 180 ml 0,8 M Natriumchlorid, zum Entwickeln der gebundenen Proteine eingesetzt, wobei Fraktionen von 4,0 ml aufgefangen wurden. Der Faktor VIII eluierte als einzelner scharfer Peak bei 0,52 M Natriumchlorid mit einer Gesamtausbeute von 87 % Faktor VIIIR:Ag, 85 % Faktor VIIIR:CoF, 75 % Faktor VIIIC:Ag und 44 % Faktor VIII:C. Dieser wurde vollständig von dem gesamten Plasminogen, das bei 0,15 M NaCl eluierte, von der Masse des Fibrinogens, das als zwei unterschiedliche Komponenten bei 0,295 M Natriumchlorid und 0,375 NaCl eluierte, und von dem Faktor IX, der bei 0,40 M NaCl eluierte, getrennt. Es wurde nur wenig Fibronectin gefunden, was zeigt, daß die Anfangsbehandlung mit Gelatine-Sepharose zur Entfernung von mehr als 98,5 % des in dem ursprünglichen Kryopräzi-

pitats vorhandenen Fibronectins wirksam war. Immunoglobulin G (IgG) wurde in zahlreichen Fraktionen, insbesondere dem aus der Säule eluierenden Leermaterial nachgewiesen, jedoch wurde weniger als 1 % des gesamt aufgefangenen IgG in den Fraktionen gefunden, welche Faktor VIII enthielten. Es wurde gefunden, daß Immunoglobulin M im Anschluß an den Faktor VIII bei 0,62 M Natriumchlorid eluiert. Die Spitzenaktivität der Aktivität des proteolytischen Enzyms, gemessen unter Verwendung des chromogenen Substrates S2222 zeigte, daß der größte Teil der Faktor Xa-ähnlichen Aktivität zusammen mit dem ersten der Fibrinogenspitzen bei 0,295 M Natriumchlorid eluierte. Die dem Faktor VIII entsprechenden Fraktionen enthielten nachweisbare Mengen an Aktivität von proteolytischem Enzym, gemessen mit S2222 (Faktor Xa) (etwa 10 % der in dem Gesamtauat aus der Säule gefundenen Menge) und S2238 (Thrombin, etwa 25 % der im Gesamteluat gefundenen Menge). Diese Aktivitäten von proteolytischem Enzym wurden nicht durch die Behandlung bei 4°C mit 10 Gew./Vol.-% Polyethylenglykol 6000 ausgefällt. Diese Behandlung fällte quantitativ den gesamten Faktor VIII aus. Die einzigen anderen Hauptproteine, welche als vorhanden in der Faktor VIII-Präparation gefunden wurden, waren verschiedene Typen von Lipoproteinen. Diese konnten vom Faktor VIII mittels Ultrazentrifugiermethoden getrennt werden.

#### Beispiel 6

#### Reinigung von Faktor VIII-Komplex aus Kryopräzipitat durch Säulenchromatographie unter Verwendung eines linearen Natriumchloridgradienten kombiniert mit einem konkav abnehmenden pH-Gradienten

Eine silikonbehandelte Glassäule von 60 x 1,6 cm wurde mit dem gemäß Beispiel 1 hergestellten, an Sepharose 4B gebundenen Dextransulfat gefüllt und mit 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 mM Kalziumchlorid und 0,075 M Natriumchlorid bei pH = 7,3 und bei 4°C ins Gleichgewicht gesetzt. Zwei Gesamtbeutel von Kryopräzipitat von Bluttransfusionsdiensten wurden bei 37°C



aufgetaut, Gesamtvolumen 40 ml, und auf 100 ml mit Gleichgewichtspuffer aufgefüllt. Die Lösung wurde dann auf pH = 7,3 unter Verwendung von 50 mM Salzsäure titriert und bei Zimmertemperatur und 2000x g während 15 Minuten zur Entfernung irgendwelcher Präzipitate (Ausfällungen) zentrifugiert. 20 ml der erhaltenen, überstehenden Flüssigkeit wurden auf 50 ml mit weiterem Gleichgewichtspuffer verdünnt und auf die Säule aufgegeben und bei 42 ml/h eluiert. Nachdem gefunden wurde, daß das nichtgebundene Material eluiert war, wurden die Proteine entwickelt, wobei ein Zweikammer-Linearsalzgradient, enthaltend 450 ml 0,15 M Natriumchlorid, 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 M Kalziumchlorid, pH = 7,6, und 450 ml 1,00 M Natriumchlorid, 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 mM Kalziumchlorid, pH = 5,8, bei 4°C verwendet wurde. Dieser Gradient war linear hinsichtlich der Natriumchloridkonzentration und konkav hinsichtlich des pH-Wertes. Eine gute Trennung des Faktor VIII-Komplexes von den anderen gebundenen Proteinen wurde erreicht: Fibrinogen eluierte als einzelner Bestandteil bei 0,30 M Natriumchlorid und pH = 6,9, Fibronectin bei 0,42 M Natriumchlorid und pH = 6,63 und Faktor VIII bei 0,51 M Natriumchlorid und pH = 6,4. Die Ausbeute an Faktor VIII im Vergleich zu der auf die Säule aufgegebenen Gesamtmenge betrug 65 % Faktor VIII:Ag, 65 % Faktor VIII:Ag mit 35 % Faktor VIII:C-aktivität.

#### Beispiel 7

#### Reinigung des Faktor VIII-Komplexes aus Kryopräzipitat durch Säulenchromatographie unter Verwendung eines linearen Natriumchloridgradienten kombiniert mit einem konvex abnehmendem pH-Gradienten

Eine silikonbehandelte Säule von 60 x 1,6 cm wurde mit der gemäß Beispiel 1 hergestellten Matrix aus Dextransulfat-Sepharose 4B gefüllt. Das Harz wurde bei 4°C mit 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 mM Kalziumchlorid in 1,0 M Glycin bei pH = 7,3 ins Gleichgewicht gesetzt. Zwei Beutel von Kryopräzipitat von Blood Transfusion Service wurden bei 37°C aufgetaut, vereinigt und

auf 100 ml mit Gleichgewichtspuffer verdünnt und auf pH = 7,3 mit 0,05 M Salzsäure eingestellt. Nach dem Zentrifugieren bei Zimmertemperatur zur Entfernung irgendwelcher teilchenförmigen Materialien wurden 20 ml der überstehenden Flüssigkeit auf 50 ml verdünnt und auf die Chromatographiesäule aufgegeben und bei 4°C und 42 ml/h entwickelt. Nachdem gefunden worden war, daß alles nichtgebundene Material eluiert worden war, wurden die gebundenen Proteine mit einem einfachen Zweikammergradienten, enthaltend 450 ml des anfänglichen Gleichgewichtspuffers und 450 ml von 1,0 M Glycin, 1,0 M Natriumchlorid, 2,1 mM Kalziumchlorid, pH = 5,5, entwickelt, wobei sich ein Elutionsprofil ergab, das linear hinsichtlich der Natriumchloridkonzentration, jedoch konvex hinsichtlich des sich erniedrigenden pH-Wertes war. Ebenso wie bei Beispiel 4 ergab sich eine gute Trennung des Faktors VIII von den meisten Plasmaproteinen. Fibrinogen eluierte bei 0,15 M Natriumchlorid und pH = 7,0, Fibronectin bei 0,28 M Natriumchlorid und pH = 6,7, sowie Faktor VIII bei 0,38 M Natriumchlorid und pH = 6,5, wobei Gesamtausbeuten von 100 % Faktor VIIIR:Ag, 100 % Faktor VIIIR:CoF, 65 % Faktor VIIIC:Ag und 35 % Faktor VIII:C erhalten wurden.

#### Beispiel 8

##### Reinigung von Faktor VIIIR:Ag und Faktor VIIIC:Ag durch Säulenchromatographie auf an Glasperlen gebundenem Dextransulfat

2,5 g Glasperlen mit kontrollierter Porengröße (Produkt von Electro. Nucleonics Inc., Fairfield, N.J., USA) mit einer Maschengröße von 120/200 und einem mittleren Porendurchmesser von 3125 Å wurden gewaschen und mit 500 ml eines 1 % Gelatine in 0,05 M Phosphatpuffers bei pH = 7,2 für zwei Stunden bei Umgebungstemperatur ins Gleichgewicht gesetzt. Es wurde Glutaraldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1 Vol./Vol.-% zugesetzt, dann wurde 5 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und dann weitere 16 Stunden stehen gelassen. Das überschüssige Protein und der überschüssige Glutaraldehyd wurden durch Waschen der Perlen mit 1 M Natriumchlorid und abschließend mit destilliertem Wasser entfernt. 20 ml der erneut suspendierten Perlen wurden zu 100 ml

Dextransulfat (20 mg/ml) zugesetzt, und es wurden 2 g Bromcyan unter Rühren zugesetzt, wobei der pH-Wert zwischen 10 und 11 durch Zugabe von 4 N Natriumhydroxidlösung für 30 min bei 4°C gehalten wurde. Die Zugabe von weiterem Natriumhydroxid wurde unterbrochen, und der pH-Wert wurde sich auf pH = 8,5 für 20 Stunden bei Zimmerumgebungstemperatur stabilisieren gelassen. Die Perlen wurden abfiltriert und mit 1,0 M Natriumchlorid gewaschen. Die Perlen wurden dann in eine silikonbehandelte Glassäule von 20 x 0,9 cm eingefüllt und mit 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid, pH = 6,85, bei Zimmerumgebungstemperatur und Aufrechterhaltung einer Strömungsrate von 20 ml/h ins Gleichgewicht gesetzt. 5 ml normales, gesammeltes Plasma, verdünnt auf 15 ml mit Gleichgewichtspuffer wurde auf die Säule aufgegeben. Nach Elution des gesamten Leermaterials wurde die Säule entwickelt, wobei ein linearer Salzgradient von 100 ml Gleichgewichtspuffer plus 100 ml 1,0 M Natriumchlorid im selben Puffer bei pH = 6,85 verwendet wurde. Es wurde eine gute Trennung des Faktors VIIIR:Ag von Fibrinogen erreicht, wobei Fibrinogen als Doppelpeak bei 0,25 M und 0,3 M Natriumchlorid eluierte, während der Faktor VIIIR:Ag mit einer Ausbeute von 71 % als einzelner Bestandteil bei 0,55 M Natriumchlorid eluierte.

Der Faktor VIIIR:Ag war mit Fibronectin verunreinigt, dieses wurde chromatographisch als Einzelbestandteil bei 0,51 M Natriumchlorid mit einer Ausbeute von 86 % abgetrennt. Der Faktor VIIIC:Ag war von dem Faktor VIIIR:Ag bei einer Gesamtausbeute von 55 % und Elution als Einzelbestandteil bei 0,45 M Natriumchlorid getrennt.

#### Beispiel 9

#### Reinigung von Faktor VIII unter Anwendung der "stufenweise" Elution aus Chromatographiesäulen

Gemäß Beispiel 1 hergestellte Dextransulfat-Sepharose 4B-Matrix wurde in silikonbehandelte Glassäulen von 3,5 cm Länge und 5,0 cm Weite eingefüllt und bei 4°C und einer Strömungs-

rate von 40 ml/h unter Verwendung eines Gleichgewichtspuffers mit einem Gehalt von 1,0 M Glycin, 14 mM Trinatriumcitrat und 2,1 mM Kalziumchlorid, pH = 7,3, eluiert. Zwei Spendermengen von Bluttransfusions-Kryopräzipitat wurden bei 37°C aufgetaut, das Volumen wurde auf 100 ml mit Gleichgewichtspuffer aufgefüllt und der pH-Wert unter Verwendung von 50 mM Salzsäure auf 7,3 eingestellt. Nach einem vorangehenden Zentrifugieren bei 2000 x g bei Zimmertemperatur zur Entfernung irgendwelcher teilchenförmigen Materialien wurden 20 ml der überstehenden Flüssigkeit auf 50 ml mit Gleichgewichtspuffer verdünnt und auf die Chromatographiesäule bei einer konstanten Strömungsrate von 40 ml/h aufgegeben, wobei Fraktionen von 7,5 ml aufgefangen wurden. Nachdem die Elution des Leermaterials abgeschlossen war, wurde die Säule zuerst mit einem "Zwischenpuffer", enthaltend 1,0 M Glycin, 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid und 0,175 M Natriumchlorid, pH = 7,0, eluiert, wobei die Strömungsrate auf 40 ml/h gehalten wurde, dann wurde mit einem "Endpuffer", enthaltend 1,0 M Glycin, 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 mM Kalziumchlorid, 0,5 M Natriumchlorid, pH = 6,2, eluiert, wobei die Strömungsrate auf 200 ml/h erhöht wurde. Es wurde kein nachweisbarer Faktor VIII und nur 0,04 % des Anfangs-Fibrinogens in den Leermaterialien, welche aus der Säule eluierten, gefunden. 86 % des Anfangs-Fibrinogens wurden mit dem "Zwischenpuffer" eluiert, wobei nur 0,2 % des Anfangswertes des Faktors VIIIR:Ag und 7,5 % des Faktors VIIIC:Ag, welcher keine nachweisbare Aktivität von Faktor VIII:C besaß, mit eluiert wurden. Im Gegensatz dazu enthielt das Material, welches bei der höheren Strömungsrate unter Verwendung des "Salzendpuffers" eluierte, weniger als 0,2 % des Anfangs-Fibrinogens, 60 % an Faktor VIIIR:Ag, 20 % an Faktor VIIIC:Ag und 22 % an Faktor VIII:C-aktivität. Die Analyse dieser Fraktion durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) plus ELISA-Messungen zeigte, daß die einzigen Hauptkomponenten außer dem Faktor VIII Phospholipide waren. Diese konnten durch Zentrifugieren der durch Behand-

lung mit 10 % Polyethylenglykol 6000 gebildeten Präzipitate bei 65 000 x g, wobei das Lipoprotein auf der Oberfläche schwamm, getrennt werden. Eine andere "Endpuffer"-lösung enthält 1,0 M Glycin, 14 mM Trinatriumcitrat, 2,14 mM Kalziumchlorid und 0,5 M Natriumchlorid, pH = 7,3, wobei vergleichbare Gesamtausbeuten erhalten werden.

#### Beispiel 10

##### Ansatzweise Reinigung von Faktor VIIIIR:vWp

Es wurde Dextransulfat-Sephrose 4B nach der Bromcyanmethode wie in Beispiel 1 hergestellt. Die Matrix wurde bei 0,15 M Natriumchlorid, 14 mM Trinatriumcitrat und 2,14 mM Kalziumchlorid, pH = 6,85, ins Gleichgewicht gesetzt und mit einem gleichen Volumen an frischem, citrierten, plättchenarmem Plasma plus zwei Volumina an Gleichgewichtspuffer bei Zimmertemperatur vermischt. Die Matrix wurde während 30 Minuten vorsichtig gerührt und dann bei +10°C und 3000 x g während 10 Minuten zentrifugiert und <sup>die</sup> überstehende Flüssigkeit verworfen. Die gewaschenen Dextransulfatperlen wurden abschließend in einem Volumen des Puffers gleich dem ursprünglichen Plasma mit einem Gehalt von 0,80 M Natriumchlorid suspendiert und 30 Minuten hiermit vermischt. Das Harz wurde erneut bei +10°C abzentrifugiert und die den eluierten Faktor VIIIIR:vWp enthaltende überstehende Flüssigkeit entfernt. Die Ausbeute an Faktor VIIIIR:vWp bei der ansatzweisen Arbeitsweise entspricht 60 % des aufgebrachten Gesamtmaterials.

#### Beispiel 11

##### Ansatzweise Entfernung von Fibrinogen aus Kryopräzipitat

Entsprechend der Arbeitsweise von Beispiel 1 wurde Dextransulfat-Sephrose 4B-matrix nach der Bromcyanmethode hergestellt. 7 ml des gewaschenen Harzes wurden in einem gleichen Volumen an Puffer, enthaltend 14 mM Trinatriumcitrat, 2,1 mM Kalziumchlorid, pH = 6,85, bei +4°C wieder suspendiert. 7 ml an wiederaufgelöstem Kryopräzipitat von Bluttransfusionsserum wurden zugesetzt, und das Röhrchen wurde kontinuierlich

für 60 Minuten vorsichtig gemischt. Das Röhrchen wurde bei 2000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit entfernt. Das Gel wurde erneut in einem gleichen Volumen an Gleichgewichtspuffer für 5 Minuten suspendiert, zentrifugiert und die überstehenden Flüssigkeiten entfernt. Der Fibrinogengehalt der vereinigten, überstehenden Flüssigkeiten machte weniger als 5 % des Anfangsfibrinogens aus, wobei jedoch 85 % des Anfangsfaktors VIII:Ag und 50 % des Anfangsfaktors VIII:C vorlagen. Bei 4°C ist die Kinetik der Bindung des Proteins an die Matrix derart, daß die Bindung des Fibrinogens rasch ist, während diejenige des Faktor VIII-Komplexes langsam ist. Nur im Anschluß an eine Inkubation mit der Matrix bei 4°C während 22 Stunden ergibt eine Kombination von mehr als 90 % des Anfangsfaktors VIII mit der Matrix. Die Prinzipien der in diesem Beispiel angewandten Arbeitsweise liefern eine Methode für die Entfibrinierung von Gesamtplasma vor der weiteren Reinigung von nichtgebundenem Faktor VII-Komplex.